



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0101757 호
Application Number 10-2003-0101757

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 31일
Date of Application DEC 31, 2003

출 원 인 : 주식회사 삼양제넥스
Applicant(s) SAMYANG GENEX CORPORATION

2005 년 1 월 10 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【제명】	특허출원서
【제구분】	특허
【신청처】	특허청장
【출원일자】	2003.12.31
【제명의 명칭】	식물 세포 배양에서 알키노산 및 알키노산의 염을 이용 한 이차 대사산물의 대량 생산방법
【제명의 영문명칭】	A method for mass production of secondary metabolites in plant cell culture by treatment of an alkanolic acid or salt thereof
출원인	
【명칭】	주식회사 삼양제넥스
【출원인 코드】	1-1998-002549-0
발명자	
【성명의 국문표기】	김창현
【성명의 영문표기】	KIM, CHANG-HEON
【주민등록번호】	680514-1845817
【우편번호】	301-151
【주소】	대전광역시 중구 태평1동 유등마을아파트 104동 602호
【국적】	KR
발명자	
【성명의 국문표기】	손주선
【성명의 영문표기】	SON, JOO-SUN
【주민등록번호】	690918-1552416
【우편번호】	302-768
【주소】	대전광역시 서구 탄방동 한우리아파트 105-303
【국적】	KR
발명자	
【성명의 국문표기】	김진아
【성명의 영문표기】	KIM, JIN-AH
【주민등록번호】	760923-2537112
【우편번호】	580-050
【주소】	전라북도 정읍시 상동 주공아파트 6동 304호
【국적】	KR

발명자			
【성명의 국문표기】	윤정환		
【성명의 영문표기】	YUN,JEONG HWAN		
【주민등록번호】	700203-1068613		
【우편번호】	302-777		
【주소】	대전광역시 서구 둔산2동 샘머리아파트 104동 1004호		
【국적】	KR		
발명자			
【성명의 국문표기】	나광휘		
【성명의 영문표기】	NA,GWANG HWEE		
【주민등록번호】	670217-1550714		
【우편번호】	305-752		
【주소】	대전광역시 유성구 송강동 송강청솔아파트 207-905		
【국적】	KR		
발명자			
【성명의 국문표기】	송재영		
【성명의 영문표기】	SONG,JA1 YOUNG		
【주민등록번호】	631007-1408316		
【우편번호】	302-782		
【주소】	대전광역시 서구 심천동 국화아파트 201동 506호		
【국적】	KR		
발명자			
【성명의 국문표기】	최호준		
【성명의 영문표기】	CH01,H0-JOON		
【주민등록번호】	611025-1066812		
【우편번호】	305-390		
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 103동 406호		
【국적】	KR		
특지	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 출원인 주식회사 삼양		
주소	제박스 (인)		
수수료			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	12	면	12,000 원

【우선권 주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】	41,000			원
첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1종			

【요약서】

요약

발명은 식물세포배양에서 이차대사산물을 대량 생산하는 방법에 관한 것으로서, 제적으로 식물 세포를 배양할 때 배양 매지에 알카노산 및 알카노산의 염을 처리함으로써 식물세포의 이차대사산물 생산성을 향상시키는 것을 특징으로 하는 식물세포양을 이용한 이차대사산물의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명은 식물세포배양에 카노산 및 알카노산의 염을 처리하여 대량의 이차대사산물을 생산하는 방법을 확립여 식물세포배양을 이용한 이차대사산물 생산의 산업화에 크게 기여할 수 있다.

표도

도 4

【명세서】

발명의 명칭]

식물 세포 배양에서 알카노산 및 알카노산의 염을 이용한 이차 대사산물의 대량

산방법 {A method for mass production of secondary metabolites in plant cell

ture by treatment of an alkanolic acid or salt thereof}

E면의 간단한 설명]

1a는 텍사스 취넨시스 (*Taxus chinensis*) 세포주 SYG-1을 배양하면서 배양 후 7일 배양 배지에 소듐 부티레이트를 0 ~ 10 mM의 농도로 처리한 후 세포조건증량의 화를 측정한 결과를 나타낸 것이고,

1b는 SYG-1을 배양하면서 배양 후 7일에 배양 배지에 소듐 부티레이트를 0 ~ 10 의 농도로 처리한 후 파클리락셀의 생산 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이고,

1c는 SYG-1을 배양하면서 배양 후 7일에 각각 0, 1, 5 mM의 소듐 부티레이트를 양 배지에 처리한 후 게놈 DNA를 추출하여 전기영동을 실시한 결과이고,

2a는 SYG-1을 배양하면서 1.0 mM의 소듐 부티레이트를 배양 후 0 ~ 21일에 배양 지에 각각 처리한 후 세포조건증량의 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이고,

2b는 SYG-1을 배양하면서 1.0 mM의 소듐 부티레이트를 배양 후 0 ~ 21일에 배양 지에 각각 처리한 후 파클리락셀의 생산 양상을 분석한 결과를 나타낸 것이고,

3은 SYG-1을 배양하면서 1.0 mM의 소듐 부티레이트를 배양 매지에 배양 후 1일 배양 후 15일에 각각 7일 간격으로 1 ~ 3회까지 반복 처리한 후 파클리탁셀의 생량을 측정한 결과를 나타낸 것이고.

4는 SYG-1을 배양하면서 1.0 mM의 소듐 부티레이트를 배양 매지에 배양 후 7일 배양 후 14일에 처리한 후 택센 화합물의 생산량을 측정하여 소듐 부티레이트를 처리하지 않은 대조구와 비교하여 택센 화합물의 생산량이 증감된 비율을 % 단위로 산한 결과를 나타낸 것이고.

5a는 SYG-1을 배양하면서 0.5 mM과 1.0 mM의 소듐 프로피오네이트를 각각 배양 7일과 14일에 반복 처리한 후 세포건조중량의 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이

5b는 SYG-1을 배양하면서 0.5 mM과 1.0 mM의 소듐 프로피오네이트를 각각 배양 7일과 14일에 반복 처리한 후 파클리탁셀의 생산 양상을 분석한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

발명은 식물세포배양에서 이차대사산물을 대량 생산하는 방법에 관한 것으로서, 체적으로 식물 세포를 배양할 때 배양 매지에 알카노산 및 알카노산의 염을 처리함으로써 식물세포의 성장을 촉진하고 이차대사산물의 생산성을 향상시키는 것을 특징로 하는 식물세포배양을 이용한 이차대사산물의 제조 방법에 관한 것이다.

물은 의약품, 농약, 향신료, 색소, 식품 첨가물, 화장품 등으로 사용되어지는 쪽
 은 이차대사산물을 생산하는 유용한 자원이다 (표 1 참조). 그러나 다양한 산업 분
 에서 이차대사산물에 대한 수요가 증가하는 추세인 반면 식물로부터의 직접적인 생
 을 통한 공급은 제한이 있기 때문에 이러한 식물 기원 이차대사산물을 식물세포배
 기술을 이용하여 산업적으로 대량 생산하려고 하는 시도가 있어 왔다 (Stockigt
 의 문헌 [Plant Cell Tissue Org. Cult. 43: 914-920, 1995] 참조).

표 1]

식물의 이차대사산물

Phenylpropanoids	Alkaloids	Terpenoids	Quinones	Steroids
Anthracenins Coumarins Flavonoids Hydroxycinnamoyl derivatives Isoflavonoids Lignans Phenolacetoncs Proanthocyanidins Stilbenes Tannins	Atridines Betalaines Oxanilipdines Purinoid bases Narringonins Isoquinolines Indoles Purines Pyridines Tropanes Alkaloids	Carotenes Monoterpenes Sesquiterpenes Diterpenes Triterpenes	Anthraquinones Benzoquinones Naphthoquinones	Cardiac glycosides Pregnenolones Derivatives

려나 식물세포배양에 있어서 배양 세포주의 불안정성, 낮은 생산성, 느린 성장과
 ale-up의 문제 등으로 인하여 식물세포배양을 이용한 이차대사산물의 대량 생산은

전히 어려움을 겪고 있다. 이러한 문제점 가운데 식물세포배양의 낮은 생산성을 극
하기 위하여 여러 가지 노력이 시도된 바 있으며, 이러한 시도에는 1) 당, 질산염,
산염, 성장조절제, 전구체의 첨가 등과 같은 배양 배지의 영양 물질 조작; 2) 배양
농도, 조명, 배지의 pH, 진탕 및 통기 조건 등과 같은 배양 환경의 최적화; 3) 생산
을 증가시키기 위한 유도제 (elictor)의 처리; 4) 이차대사산물의 효과적인 회수를
위한 세포막의 투과성화 (permeabilization)와 이원상 배양 (two-phase culture); 5)
차대사산물의 생합성에 관여하는 유전자들 변형하거나 외래 유전자들 도입하여 이
차대사산물의 생산성을 증가시키는 대사공학 등의 방법이 있다. 그러나 이러한 시도
는 특정 식물세포 혹은 특정 이차대사산물에만 한정되어 긍정적인 결과를
었으며, 대다수의 식물세포배양과 이차대사산물에 일반적으로 적용될 수 있는 만족
만한 방법은 아직 확립되지 않았다.

연계에서 식물은 병원체의 공격에 대한 방어 기작으로서 이차대사산물을 생산하며,
부 식물세포배양에서도 병원체로부터 유래한 물질 (유도제, elictor)에 의해서 이
차대사산물의 생산이 촉진된다는 것이 보고된 바 있다 (미합중국 특허 제 5,019,504
참조). 이러한 유도제는 방어 기작과 관련된 유전자들을 활성화 하는 동시에
4cdc2 단백질 키나아제 (p34cdc2 protein kinase)와 유사분열시클린 (mitotic
clin)과 같은 세포 주기 조절과 관련된 유전자의 발현을 억제한다 (Logemann 등의
현 [Plant Journal 8:865-876, 1995] 참조). 또한 옥수수수의 병원균인 코크리오포투
카보눔 (*Cochliobolus carbonum*)이 생산하는 HC 독소는 히스톤 디아세틸레이즈
istone deacetylase)의 활성을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Brosch 등의 문헌
lant Cell 7:1941-1950, 1995] 참조).

부틸산 (Butyric acid) 혹은 이의 나트륨 염인 소듐 부티레이트는 히스톤 디아세틸화 효소의 저해제로서 히스톤 H3와 H4의 과아세틸화 (hyperacetylation)를 일으킨다 (Iggs 등의 문헌 [Nature 263:462-464, 1977] 참조). 또한 연구 결과 부틸산의 처리에 의한 히스톤의 아세틸화 증가는 세포의 염색체 구조 변화를 유도함으로써 전사 단백질의 활성 증가를 가져오고, 세포 분화 상태의 변화에 영향을 미치는 것이 보고되었으며 (Thorne 등의 문헌 [Eur. J. Biochem. 193:701-713, 1990] 참조), 일부 세포에서 세포 예정사 (apoptosis)를 유도하는 것으로 알려져 있다 (Bhatia 등의 문헌 [Cell Growth Diff. 6: 937-944, 1995] 참조). 상기와 같은 부틸산의 다양한 생리활성에 기초하여 일부에서는 외래 단백질의 발현을 증가시킬 목적으로 부틸산 혹은 소듐 부티레이트를 동물세포의 배양 배지에 처리하여 외래 유전자의 전사단계를 증진시키고 이로 인하여 외래 단백질의 발현 수준을 증가시키는 방법이 개발된 바 있다 (미합중국 특허 제 6,228,618호 참조).

부틸산의 다양한 생리활성에도 불구하고 아직까지 식물과 식물세포배양에 대한 부틸산의 활성과 작용기작에 대한 연구는 많이 진행되지 않았으며, 일부 연구자들에 의하면 부틸산이 식물세포의 성장과 식물 조직이나 세포의 분화에 미치는 영향에 대한 연구가 진행되었을 뿐이다 (Tramontano와 Scanlon의 문헌 [Phytochemistry 41:85-88, 1996] 참조).

발명자들은 부틸산의 다양한 생리활성에 착안하여 부틸산이 식물세포에서 세포 주기 조절과 관련된 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있으며, 이를 통하여 식물세포의 이차대사산물 생산성에도 영향을 미칠 수 있을 것임을 생각하게 되었다. 이에 발명자들은 다양한 식물세포배양에서 일반적으로 적용될 수 있는 효율적인 이차

사산물의 생산성 향상 방법을 제공하기 위하여 연구를 거듭한 결과, 식물세포 배양
위한 배양 매지에 알카노산 및 알카노산의 염을 처리하여 식물세포를 배양함으로
이차대사산물의 생산량을 증가시킬 수 있다는 것을 발견하였다. 또한 식물세포배
에 알카노산 및 알카노산의 염을 비교적 높은 농도로 처리할 경우에는 세포의 성장
현격하게 저해되지만 적절한 농도의 알카노산 및 알카노산의 염을 처리할 경우에
세포의 성장이 오히려 촉진되며, 이와 더불어 이차대사산물의 생산성도 향상된다
것을 발견하고, 알카노산 및 알카노산의 염을 처리하는 방법을 최적화하여 식물세
배양에서 이차대사산물을 대량 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였

[발명이 이루고자 하는 기술적 과제]

발명의 목적은 식물세포배양에서 이차 대사 산물을 대량 생산하는 방법을 제공하
것이다.

다 구체적으로 본 발명은 식물세포배양에서 이차대사산물의 생산성을 향상시키기
하여 알카노산 및 알카노산의 염의 종류와 처리 농도, 처리 시기 및 반복 처리 횟
등에 있어 최적의 조건을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[발명의 구성 및 작용]

기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물세포를 배양하여 이차대사산물을 대량
산하는 방법으로, 식물세포배양의 배양 매지에 알카노산 및 알카노산의 염을 처리

여 배양 세포의 성장을 촉진하고 이차대사산물의 생산성을 향상시킴으로써 식물세포 배양의 이차대사산물을 대량 생산하는 방법을 제공한다.

체적으로, 본 발명의 식물세포배양의 이차대사산물을 대량 생산하는 방법은, 1) 식물세포를 배양 배지에서 배양하는 단계와; 2) 상기의 배양 배지에 식물세포의 염색체 F 조의 변화를 유도함으로써 식물 세포의 세포 주기를 조절할 수 있는 물질인 알카산 및 알카노산의 염을 처리하는 단계와; 3) 상기의 알카노산 및 알카노산의 염을 리한 배양 배지에서 식물세포의 배양을 진행함으로써 식물 세포의 성장을 촉진하고 이차대사산물의 생산성을 향상시키는 단계; 및 4) 상기의 식물세포배양에서 이차대사산물을 대량으로 생산하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

올려, 본 발명은 상기 알카노산 및 알카노산의 염의 처리 농도, 처리 시기,반복 처리 방법 등에 있어 식물세포배양의 이차대사산물의 생산성을 향상시킬 수 있는 최적 조건을 제공한다.

하, 본 발명을 상세히 설명한다.

발명은 식물세포배양에서 식물세포의 이차대사산물 생산성을 향상시킴으로써 식물세포배양의 이차대사산물을 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.

물로부터 생산할 수 있는 이차대사산물의 종류는 매우 광범위하며, 각 식물 종과로부터 생산되는 이차대사산물의 특성에 따라 생산에 적용되는 기술은 매우 다양하다. 하기 표 2에서 식물세포배양으로 얻을 수 있는 주요 이차대사산물과 그것의 생산 사용될 수 있는 식물 세포를 도시하였다.

표 2]

물세포배양으로부터 얻어지는 주요 이차대사산물

Product	Use	Plant species
salicine	Antihypertensive	<i>Cath. roseus</i>
artemisinin	Antimalarial	<i>Artemisia annua</i>
jmaline	-	<i>Ra. serpentina</i>
cinnetine	-	<i>Acotinus</i> spp.
erberine	Intestinal ailment	<i>C. japonica</i>
amptothecin	Antitumour	<i>Camptotheca acuminata</i>
apsaicin	Counterirritant	<i>Ca. frutescens</i>
astanospermine	Glycoside inhibitor	<i>Castanospermum australe</i>
odeine	Sedative	<i>P. somniferum</i>
olchicine	Antitumour	<i>Colchium autumnale</i>
igoxin	Heart stimulant	<i>Di. lanata</i>
osgenin	Steroidal precursor	<i>Dioscorea deltoidea</i>
lilipicine	Antitumour	<i>Orchrosia elliptica</i>
netine	-	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>
orskolin	Bronchial asthma	<i>Coleus forskolii</i>
insenosides	Health tonic	<i>Panax ginseng</i>
orphine	Sedative	<i>P. somniferum</i>
odophyllotoxin	Antitumour	<i>Podophyllum peltatum</i>
uinine	Antimalarial	<i>Cinchon. ledgeriana</i>
anguinarine	Antiplaque	<i>Sanguinaria canadensis</i>
		<i>P. somniferum</i>
hikonia	Antibacterial	<i>L. erythrorhizon</i>
axol	Anticancer	<i>Taxus</i> spp.
incristine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>
inblastine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>

발명의 식물세포배양의 이차대사산물을 대량으로 생산하는 방법은 이차대사산물을 생산하는 모든 식물세포에 적용할 수 있다. 바람직하게는 일반적으로 낮은 이차대사물의 생산성을 보이는 여러 식물세포, 특히 치료저항성 난소암 및 유방암의 치료에 효과적인 것으로 입증된 파클리탁셀의 생산에 이용되는 주목(*Taxus species*) 세포 등에 융합으로써 이차대사산물의 생산성을 크게 향상시킬 수 있으며, 파클리탁셀의 산업 생산에 이를 이용할 수 있다.

주목 속에 속하는 다양한 종의 주목 세포가 본 발명의 식물세포배양의 이차대사
물을 대량 생산하는 방법에 의해 이차대사산물의 생산성을 크게 향상시킬 수 있으
. 예를 들어 텍서스 바카타 (*Taxus baccata*), 텍서스 브레비폴리아 (*Taxus
brevifolia*), 텍서스 카나덴시스 (*Taxus canadensis*), 텍서스 취넨시스 (*Taxus
chinensis*), 텍서스 쿠스피다타 (*Taxus cuspidata*), 텍서스 플로리다나 (*Taxus
floridana*), 텍서스 글로보사 (*Taxus globosa*), 텍서스 메디아 (*Taxus media*), 텍서스
발리치아나 (*Taxus wallichiana*), 텍서스 유나넨시스 (*Taxus yunnanensis*) 등에서
클리탁셀 및 텍센 화합물을 대량으로 생산할 수 있다.

기 단계 1)의 배양 배지는 당분아에 널리 공지된 바와 같이, 영양분 및 식물세포의
육력을 유지하는데 필요한 그 밖의 인자, 즉, 탄소원, 질소원, 염 및 비타민 등을
유하고 있는 것으로, 식물세포의 배양에 널리 사용되고 있는 배지들, 예를 들면 무
시케-스콧 배지(Mureshige & Skoog medium), 갠보그 배지(Gamborg B5 medium), 린
마이어-스콧 배지(Linsmaier & Skoog medium) 등을 제한 없이 사용할 수 있으며,
요에 따라 각종 첨가제를 가하거나 성분 중 일부를 제거하여 사용할 수 있다.

서스 취넨시스 (*Taxus chinensis*)를 배양하여 파클리탁셀 및 텍센 화합물을 생산하
경우 바람직한 배지는 60 g/L의 자당을 첨가한 변형 갠보그 배지이다. 이 배지의
성은 이미 당업계에 널리 공지된 것이다(대한민국 특허 제 0266448호 참조).

한 이들 배지는 선택적으로 이차대사산물의 생산을 유도하는 인자들을 포함한다.
러한 인자들로는 식물 호르몬, 이차대사산물의 생합성 전구체, 유도제 및 시그널
플러 등이 있다. 배지에 첨가되는 이러한 인자들은 다양한 경로를 통하여 식물세포

이차대사산물 생산을 자극하며, 본 발명의 알카노산 및 알카노산의 처리와 함께
차대사산물 생산성 향상에 대한 시너지 효과를 일으킬 수 있다.

서스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포배양을 통한 파클리탁셀 및 택센 화합물의 생
에 있어서, 바람직한 유도제는 질산은이었으며, 바람직한 처리 농도는 1 - 15 μ M으
배양 초기에 배지에 첨가되어 사용되었다.

기 단계 2)에 있어서, 알카노산은 단쇄상으로 연결된 탄소사슬의 말단에 카보닐기
가지고 있는 화합물로서 $C_6H_{12}O_2$ 의 화학식으로 표현된다. 알카노산의 탄소 원자는
- 9개의 탄소 길이를 가지는 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 3 - 6 개의 탄
길이가 적당하다. 또한 상기 단계 2)에 있어서, 알카노산의 염은 알칼리 금속염이
람직하며, 예를 들어 나트륨 (Na), 칼륨 (K), 칼슘 (Ca) 등이 적당하다. 택세스 취
시스(*Taxus chinensis*) 세포배양에서 파클리탁셀 및 택센 화합물을 생산하는 경우
있어서, 바람직하게 사용되는 알카노산은 부틸산 혹은 부틸산의 염, 특히 알칼리
속 염이며, 더욱 바람직하게는 소듐 부틸레이트, 소듐 프로피오네이트이다.

기 발명의 알카노산 혹은 알카노산의 염은 동물 혹은 식물세포에서 히스톤 아세틸
들 증가시켜 염색체의 구조 변화를 유도함으로써 식물세포의 주기를 조절하는 역할
수행한다. 택세스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포배양에 일정 농도 이상의 소디
부틸레이트를 처리할 경우 세포의 성장이 중단되는 것이 관찰되었다(도 1a 참조).
다, 이렇게 성장이 중단된 세포의 게놈 DNA를 추출하여 전기영동을 실시한 결과 5
농도의 소듐 부틸레이트를 처리한 경우, 세포 예정사의 특징인 일정 크기의 배
로 DNA 밴드가 나타나는 것을 볼 수 있었다 (

1c 참조). 이러한 결과를 통하여 배양된 텍서스 취넨시스 (*Taxus chinensis*)의 세포 배지에 처리된 소듐 부틸레이트의 영향으로 염색체의 구조 변화가 일어났으며, 이로 인해 세포의 성장 중단과 세포 예정사를 불러 일으켰음을 알 수 있다. 그러나 특이하게도 1 mM 농도의 소듐 부틸레이트를 처리한 경우에는 텍서스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포의 성장을 오히려 촉진하는 효과를 보여 주었다 (도 1a 참조). 이와 함께 세포배양의 파클리탁셀 생산량이 크게 증가하였으며, 대조구와 비하여 1.97 배 높은 파클리탁셀 생산성을 보여 주었다 (도 1b 참조).

기 발명의 알카노산 및 알카노산의 염을 배양 배지에 처리하는 것에 있어서, 알카노산 및 알카노산의 염의 처리 농도의 범위는 0.01 ~ 500 mM 사이에 존재하며, 바람직하게는 0.1 mM ~ 200 mM, 그리고 특히 바람직하게는 0.2 mM ~ 20 mM의 범위가 적당하다. 텍서스 취넨시스(*Taxus chinensis*) 세포 배양을 이용한 파클리탁셀 및 텍센 화물의 생산에 있어서 바람직한 알카노산 및 알카노산의 염의 처리 농도는 0.5 ~ 10 mM의 범위이며, 가장 바람직하게는 1 mM의 농도이다.

기 발명에서 알카노산 및 알카노산의 염을 처리한 배양 배지에서 식물세포의 배양 진행함으로써 식물 세포의 성장을 촉진하고 이차대사산물의 생산성을 향상시키는 것에 있어서, 알카노산 및 알카노산의 염이 처리된 배양 배지에서 배양하는 기간, 즉 식물세포가 알카노산 및 알카노산의 염에 노출되는 시간은 최초로 배양 배지의 식물세포가 알카노산 및 알카노산의 염에 노출되는 시기, 즉 알카노산 및 알카노산의 염 배양 배지에 처리하는 시기에 의해 결정된다 (

2a, b 참조). 바람직한 알카노산 및 알카노산의 염의 처리 시기는 식물세포가 배
매지에 접종되기 이전, 즉 초기 배지 단계에서부터 세포의 성장과 활성이 완료되
시점까지이며, 특히 바람직하게는 세포 배양의 대수성장기 초기에 해당한다. 텍스
취넨시스 (*Taxus chinensis*)의 세포 배양을 통하여 파클리탁셀 및 텍센 화합물을
산하려고 할 때에 있어서, 바람직한 알카노산 및 알카노산의 염의 처리시기는 배양
0일에서 배양 후 21일 까지이며, 특히 바람직하게는 배양 후 0일부터 14일까지이

기 발명에서 제공하는 알카노산 및 알카노산의 염의 처리로부터 얻어지는 식물세포
생리적인 변화, 특히 히스톤 디아세틸레이즈의 활성 저해나 세포 주기 조절 관련
전자의 발현 억제와 같은 변화는 가역적인 변화로서 배지에 처리된 알카노산 및 알
카노산의 염이 식물세포에 의해 대사되어 소모되거나 분해되어 소멸될 경우, 알카노
산 및 알카노산의 염의 처리로 인해 유도된 식물 세포의 특성의 변화는 곧 원래의 상
로 돌아오게 된다. 따라서 알카노산 및 알카노산의 염이 지속적으로 식물세포에 영
을 주고 최종적으로 이차대사산물의 생산성 향상 효과가 장기간 지속되게 하기 위
여, 배양 매지에 최초로 알카노산 및 알카노산의 염을 처리한 후 일정 간격으로 1
이상 반복 처리하는 방법이 바람직하다. 텍세스 취넨시스 (*Taxus chinensis*) 세포
양을 통한 파클리탁셀 및 텍센 화합물의 생산에 있어서 바람직한 알카노산 및 알카
산의 염의 처리 횟수는 1 ~ 3회 이며, 특히 바람직하게는 2 ~ 3회이다. 또한 식물
포배양에 대한 알카노산 및 알카노산의 최초 처리 시기는 배양 후 0일에서 배양 후
1일의 범위가 바람직하다.

기의 발명에 있어서, 식물세포의 배양 방법은 당업계에 널리 공지된 적절한 식물세포의 배양 방법이 모두 사용될 수 있다. 회분식 배양 (batch culture), 연속식 배양 (continuous culture), 유가식 배양 (fed-batch culture), 반연속식 회분 배양 (semi-continuous batch process), 고정화 배양 (immobilized culture), 이원상 배양 (two-phase culture) 등의 배양 방법으로 식물세포를 배양하면서 배양 배지에 알카산 및 알카노산의 염을 처리함으로써 이차대사산물의 대량 생산을 실현할 수 있다. 식물세포는 세포의 특성과 이차대사산물의 특성에 따라 적절한 배양방법을 선택할 수 있다.

발명에서 제공하는 방법으로 텍서스 취넨시스 (*Taxus chinensis*) 세포를 배양하면 파클리탁셀 및 텍센 화합물을 생산할 경우, 파클리탁셀의 생산성은 약 6배 이상 가하였으며, 텍센 화합물의 생산성은 각 텍센 화합물의 종류에 따라 약 1.6 배에서 9 배까지 증가하였다.

한 본 발명의 방법을 이용하여 비파 (*Eriobotrya japonica*)의 세포배양에서 인슐린 의존형 (Type II) 당뇨병의 치료제로 사용할 수 있는 코로솔산 (corosolic acid) 및 갓 (*Chrysanthemum coronarium* L.)의 세포배양에서 콜레스테롤 저하제로 사용할 수 있는 β -시토스테롤 (β -citosterol) 등의 생산성을 증가시킬 수 있다.

하, 본 발명을 하기 실시예에 의거하여 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단 하기 시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

시예 1: 소듐 부티레이트의 처리 효과

시예 1-1 : 소듐 부티레이트 처리 농도의 효과

실시예에서는 식물세포배양의 이차대사산물 생산에 사용하기 위한 세포주로서 공의 텍세스 취넨시스 (*Taxus chinensis*) SYG-1 세포주 (KCTC-0232BP)를 이용하였으. 이 세포주는 파클리탁셀 및 텍산 화합물을 생산할 수 있다. 250 mL의 삼각플라스에 60 g/L의 자당을 포함하는 상기의 배지 (대한민국 특허 제 0266448호 참조) 50와 30 g/L의 자당을 포함하는 상기의 배지에서 14일간 배양된 SYG-1의 배양액 50을 넣고 암조건에서 24℃, 150 rpm으로 14일간 배양한 후, 배양 온도를 29℃로 변하여 28일간 배양하였다. SYG-1의 파클리탁셀 생산성을 증가시키기 위하여 배양개일로부터 7일째에 각각 0, 0.5, 1, 5, 10 mM 농도의 소듐 부티레이트를 리하고, 배양 14, 21, 28, 35, 42일째에 각각 임의의 샘플을 취하여 세포의 성장경와 파클리탁셀의 생산량을 측정하였다.

포의 성장정도는 세포 건조중량 (dry cell weight, DCW)의 측정을 통해 찰하였다. 세포 건조중량은 임의로 채취된 식물세포 배양액을 흡인여과기 (Buchner nnel)을 이용하여 와트만 4번 여과지로 여과하여 얻은 세포를 60 ℃의 건조오븐에 24시간 동안 건조하여 측정한 중량이다.

한 파클리탁셀의 생산량은 당업계에 널리 공지된 파클리탁셀 및 텍센 화합물의 정 방법 (대한민국 특허 제 0266448호 참조)으로 정량하였다.

다음 부티레이트를 처리하여 배양한 SYG-1의 세포 성장정도 및 파클리탁셀 생산량 도 1a와 도 1b에 도시하였다. 그 결과 0.5 mM의 소듐 부티레이트를 처리했을

에는 세포 성장과 파클리탁셀 생산은 큰 변화가 없었으나, 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리한 경우에는 배양 14일부터 세포의 성장정도가 크게 증가하며, 배양 28일에 23.22 g/L로 최고 성장에 도달한 뒤 점차 감소하였다. 그러나 5 mM과 10 mM 농도 소듐 부티레이트를 처리했을 때에는 세포의 성장이 전혀 이루어지지 않고 세포 색깔이 흑갈색으로 변하며 세포괴사가 일어났다. 또한 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리했을 때에는 배양 35일에 최대 133.8 mg/L로 소듐 부티레이트를 처리하지는 대조구 보다 1.97배 많은 양의 파클리탁셀을 생산하였다.

시예 1-2 : 게놈 DNA의 추출 및 전기영동 분석

기 실시예 1-1의 방법과 같이 SYG-1을 배양하면서, 각각 0, 1, 5 mM의 소듐 부티레이트를 배양 배지에 처리하여 배양한 후 세포를 수확하여 생중량 (Fresh weight) 1 g 세포로부터 키아젠사의 게놈 DNA 추출 키트 (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, 미국)를 이용하여 제조사의 권장 시험 절차에 따라 게놈 DNA를 추출하였다. 각각 250 µg의 추출된 DNA를 이용하여 아가로스 젤 전기영동을 실시하였으며, 그 결과들 도 1c에 도시하였다.

기 실시예 1-1의 결과와 같이 배양 배지에 5 mM의 소듐 부티레이트를 처리할 경우, 세포의 성장은 중단된다. 이렇게 성장이 중단된 세포의 게놈 DNA를 추출하여 전기영동을 실시한 결과 5 mM 농도의 소듐 부티레이트를 처리한 경우, 세포 예정사의 특징인 일정 크기의 배수로 DNA 밴드가 나타나는 것을 볼 수 있었다. 이러한 결과들 하여 배양된 텍사스 침팬시스 (*Taxus chinensis*)의 세포가 배지에 처리된 소듐 부티레이트의 영향으로 염색체의 구조 변화를 일으켰으며, 이로 인해 세포의 성장 중과 세포 예정사를 불러 일으켰음을 알 수 있다

시예 2: 소듐 부티레이트 처리 시기

기 실시예 1-1의 방법과 같이 SYG-1 세포를 배양하고, 1 mM 농도의 소듐 부티레이트를 각각 배양개시일, 배양 7일, 배양 14일 배양 21일에 처리한 뒤, 배양 14, 21, 35, 42일째에 각각 임의의 샘플을 취하여 세포의 성장경도와 파클리탁셀의 생산을 상기 실시예 1의 방법에 따라 측정하였다.

2a는 소듐 부티레이트의 처리시기를 달리하였을 때의 세포 건조중량의 변화를 시한 것이고, 도 2b는 파클리탁셀 생산량의 변화를 도시하였다. SYG-1 배양세포에 mM 농도의 소듐 부티레이트를 처리할 때 세포의 성장 속도는 처리시기에 관계없이 처리하지 않았을 때보다 빨라지는 경향을 보여 주었다. 도 2a의 결과를 바탕으로 mM 소듐 부티레이트의 처리 시기에 따른 SYG-1의 최대 비성장속도를 구하여 표 3에서 비교하여 보았다. 최대 비성장속도는 소듐 부티레이트의 처리시기가 빠를수록 있으며, 최대 세포건조중량에 도달하는 시간도 빨라졌다. 그러나 최대 세포건조중량은 배양 후 7일에 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리하였을 때에 23.22 mg/L로 가장 높았다. 또한 파클리탁셀의 생산량은 1 mM의 소듐 부티레이트를 배양 후 7일에 처리했을 때에 가장 높은 파클리탁셀 생산량을 보였다.

표 3)

처리 조건	최대 비성장속도 (μmm^{-1})
대조구 (대조구)	0.035
배양 0일	0.078
배양 7일	0.066
배양 14일	0.038
배양 21일	0.039

시예 3 : 소듐 부티레이트의 반복 처리

기 실시예 1-1의 방법과 같이 SYG-1 세포를 배양하고, 1 mM 농도의 소듐 부티레이트를 각각 배양 후 1일과 배양 후 15일에 처리하고 7일 간격으로 다시 동일 농도의 소듐 부티레이트를 처리하는 과정을 반복하여 최대 3회까지 실시한 후 배양을 계속하면서 배양 후 30일과 37일의 파클리락셀의 생산량을 측정하여 그 결과를 도 3에 시하였다.

양 1일에 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리하기 시작하여 7일 간격으로 최대 3회까지 소듐 부티레이트를 반복 처리한 결과 파클리락셀의 생산성은 처리 횟수에 따라 가하는 경향을 보여 주었으며, 1 mM 농도의 소듐 부티레이트 3회까지 반복 처리한 경우, 배양 후 37일에는 대조구와 비교하여 6.43배 높은 파클리락셀을 생산하였다. 또한 배양 후 15일에 1 mM의 소듐 부티레이트를 처리하기 시작하여 7일 간격으로

최대 3회까지 소듐 부티레이트를 반복 처리한 경우에는 2회 반복 처리하였을 때 파클리탁셀의 생산이 가장 높았으며, 이때의 생산량은 대조구에 비교하여 4.95 배는 생산량이었다.

시예 4 : 소듐 부티레이트의 처리에 의한 택센 화합물의 생산

기 실시예 1-1의 방법과 같이 SYG-1 세포를 배양하고, 1 mM 농도의 소듐 부티레이트를 배양 후 7일과 14일에 처리한 후 배양을 계속하면서 배양 후 28일, 36일, 43일에 파클리탁셀의 생산량을 측정하여 그 결과들 도 4에 도시하였다.

4에 도시한 바와 같이 소듐 부티레이트의 처리에 의해 모든 택센 화합물의 생산 크게 증가하는 것을 알 수 있었으며, 특히 배양 후 28일에는 대조구에 비하여 약 6 배에서 약 9 배까지 생산성이 크게 증가하였다. 배양 후 36일에는 그 증가폭이 13 배로 약간 줄어들었으며, 배양 후 43일에는 그 증가폭이 더욱 줄어들었다. 이러한 경향은 소듐 부티레이트에 의한 이차대사산물의 생산성 증가 효과가 일종의 유도 효과(induction effect)로서 지속적이지 않으며 소듐 부티레이트 처리 후 일정 기간 동안 이차대사산물의 생산이 유도된 후 다시 원래의 상태로 돌아가는 경향을 보을 알 수 있다. 또한 소듐 부티레이트에 의한 생산성 증가 현상이 파클리탁셀에 한정되는 것이 아니라 모든 이차대사산물에 일반적으로 적용되는 것임을 알 수 있다.

시예 5 : 소듐 프로피오네이트의 처리

기 실시예 1-1의 방법과 같이 SYG-1 세포를 배양하고, 1 mM 농도의 소듐 프로피네이트를 배양 후 6일과 13일에 처리한 후 배양을 계속하면서 세포의 성장경도와 파클리택셀의 생산량을 측정하여 그 결과물 도 5a와 도 5b에 도시하였다.

5a에 도시한 것과 같이 소듐 프로피오네이트의 처리에 의하여 세포의 성장속도 증가하였으며, 소듐 프로피오네이트의 처리 농도가 0.5 mM보다 1 mM 일 때, 또 처리 횟수가 1회일 때보다 2회 처리하였을 때에 세포 건조중량이 더욱 높았음을 수 있었다. 또한 도 5b에 도시한 것과 같이 파클리택셀의 생산도 세포건조중량의 우와 같이 소듐 프로피오네이트의 농도가 높을수록, 처리횟수가 많을수록 파클리셀이 더욱 많이 이루어졌음을 알 수 있었다. 소듐 프로피오네이트는 탄소원자가 존재하는 알카노산의 일종으로 상기 실시예에서 밝힌 소듐 부틸레이트의 식물포배양에 대한 이차대사산물 생산성 증가 효과가 소듐 부틸레이트에만 국한되는 이 아니라 다른 알카노산 계열 화합물들도 이러한 효과를 기대할 수 있음을 보여준다.

발명의 효과

기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 식물세포배양에서 이차대사산물의 생산성을 증가시킬 수 있는 물질인 알카노산 및 그 염의 처리를 통하여 식물세포의 이차사산물을 대량으로 생산하는 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 따르면 일적으로 그 생산성이 매우 낮은 것으로 알려진 식물세포배양의 이차대사산물의 생산

을 크게 향상시킬 수 있으므로, 파클리탁셀, 베타-시토스테롤, 코로소릭산 등의 산
적으로 유용한 식물기원 이차대사산물의 산업적 생산에 크게 기여할 수 있다.

특허청구범위]

요구항 1]

양 폐지에 알카노산 및 알카노산의 염을 처리하여 식물세포를 배양함으로써 이차대산물의 생산성을 증가시킴을 특징으로 하는 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 산방법.

요구항 2]

Ⅱ 1항에 있어서, 식물세포는 *Taxus* 속의 종으로부터 유도된 식물세포임을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

요구항 3]

Ⅱ 2항에 있어서, 식물세포는 텍세스 취넨시스(*Taxus chinensis*)로 하는 것을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

요구항 4]

Ⅱ 1항에 있어서, 이차대사산물은 파룰리락셀 또는 텍센 화합물로 하는 것을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

요구항 5]

Ⅱ 1항에 있어서, 알카노산은 탄소원자를 1 ~ 9개까지 포함하는 단일체상의 알카노인 것을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

3구항 6]

Ⅱ 5항에 있어서, 상기 알카노산은 소듐 부티레이트, 소듐 프로피오네이트임을
경으로 하는 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

3구항 7]

1항에 있어서, 알카노산의 염은 나트륨, 칼륨, 칼슘 등의 알카리 금속 이온을 포
하는 것을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

3구항 8]

Ⅱ 1항에 있어서, 알카노산 또는 알카노산의 염의 처리 농도는 0.1 mM - 20 mM의 농
로 하는 것을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

3구항 9]

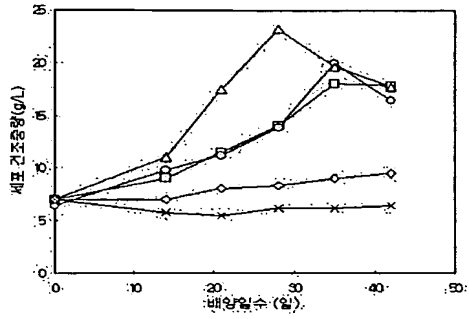
Ⅱ 1항에 있어서, 알카노산 또는 알카노산의 염의 처리 시기는 배양 0일에서 배양
일로 하는 것을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

3구항 10]

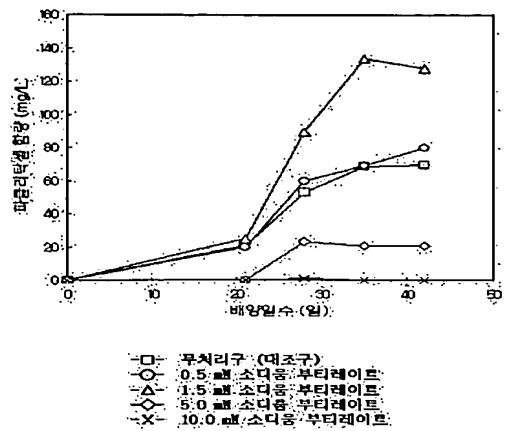
Ⅱ 1항에 있어서, 알카노산 또는 알카노산의 염의 반복 처리 횟수는 1회 내지 5회인
것을 특징으로 하는, 식물세포배양에 의한 이차대사산물의 생산방법.

【도면】

2 1a)



□ 무처리구 (대조구)
○ 0.5 mM 소디움 부티레이트
△ 1.0 mM 소디움 부티레이트
◇ 5.0 mM 소디움 부티레이트
× 10.0 mM 소디움 부티레이트

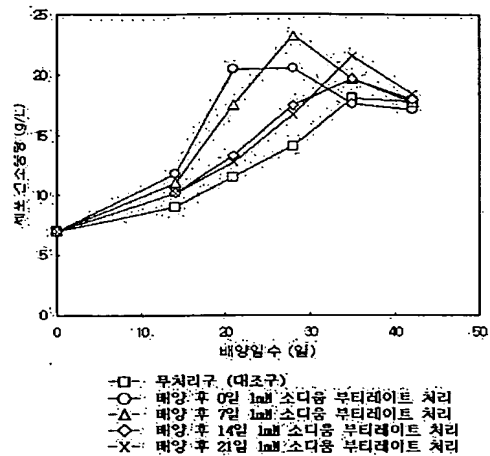


E 1c]

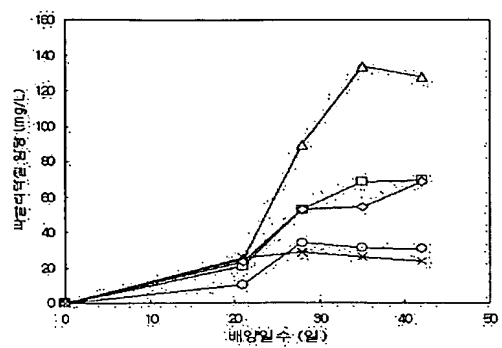


라인 A: 사이즈 마커
라인 B: 무치리구
라인 C: 1.0M 소다 용 부티레이트 치리구
라인 D: 5.0M 소다 용 부티레이트 치리구

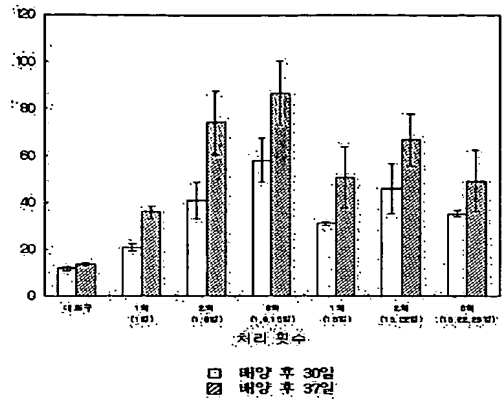
2a]

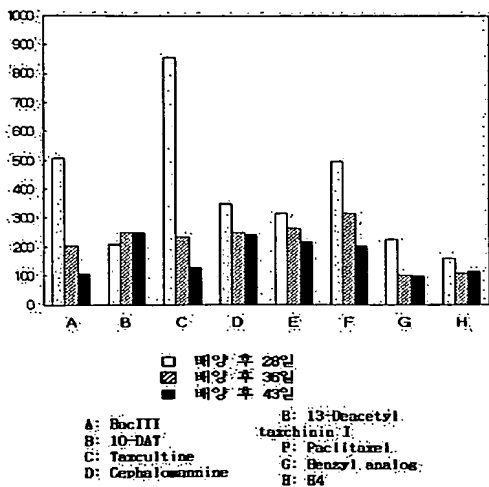


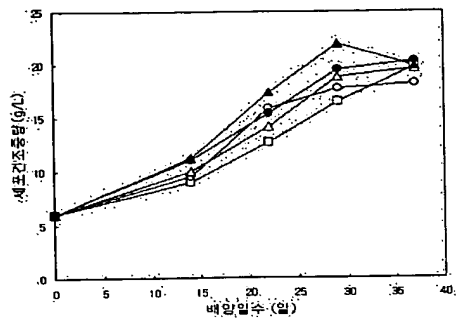
2b]



□ 무처리구 (대조구)
○ 퇴양 후 0일 1배 소디움 부티레이트 처리
△ 퇴양 후 7일 1배 소디움 부티레이트 처리
◇ 퇴양 후 14일 1배 소디움 부티레이트 처리
× 퇴양 후 21일 1배 소디움 부티레이트 처리

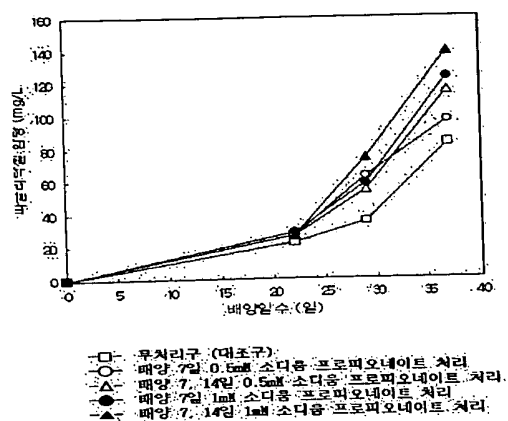






□ 무처리구 (대조구)
 ○ 배양 7일 0.5% 소디움 프로피오네이트 처리
 △ 배양 7, 14일 0.5% 소디움 프로피오네이트 처리
 ● 배양 7일 1% 소디움 프로피오네이트 처리
 ▲ 배양 7, 14일 1% 소디움 프로피오네이트 처리

5b)



Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003491

International filing date: 29 December 2004 (29.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0101757
Filing date: 31 December 2003 (31.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 14 February 2005 (14.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse